



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/82, 15/53, 15/54, 15/55, 5/10, A01H 5/00		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/02562 (43) Date de publication internationale: 22 janvier 1998 (22.01.98)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01256</p> <p>(22) Date de dépôt international: 10 juillet 1997 (10.07.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/09137 16 juillet 1996 (16.07.96) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): PALLETT, Ken [GB/GB]; Rhône-Poulenc Agriculture Ltd., Fyfield Road, Ongar Essex CMS OHW (GB). DEROSE, Richard [US/FR]; 216, rue de Saint Cyr, F-69009 Lyon (FR). PELISSIER, Bernard [FR/FR]; 49, chemin de Crécy, F-69370 Saint Didier au Mont d'Or (FR). SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Albert Chalinel, F-69009 Lyon (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie, 14/20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera publiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: CHIMERA GENE WITH SEVERAL HERBICIDE RESISTANT GENES, PLANT CELL AND PLANT RESISTANT TO SEVERAL HERBICIDES</p> <p>(54) Titre: GENE CHIMERE A PLUSIEURS GENES DE TOLERANCE HERBICIDE, CELLULE VEGETALE ET PLANTE TOLERANTES A PLUSIEURS HERBICIDES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns: 1. Chimera gene with several herbicide resistant genes, plant cell and plant resistant to several herbicides. 2. The plant is resistant both to several herbicides, particularly to HPPD inhibitors and EPSPS inhibitors and/or to dihalogenohydroxybenzonitriles. 3. Its use for weeding plants with several herbicides.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>1. Gène chimère à plusieurs gènes de tolérance herbicide, cellule végétale et plante tolérantes à plusieurs herbicides. 2. La plante est tolérante à la fois à plusieurs herbicides, notamment aux inhibiteurs de l'HPPD et à ceux de l'EPSPS et/ou aux dihalogénohydroxybenzonitriles. 3. Utilisation pour le désherbage de plantes avec plusieurs herbicides.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	VN	Viet Nam
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CG	Congo	KR	Kenya	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande		
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

GENE CHIMERE A PLUSIEURS GENES DE TOLERANCE HERBICIDE, CELLULE VEGETALE ET PLANTE TOLERANTES A PLUSIEURS HERBICIDES

5

La présente invention a pour objet un gène chimère à plusieurs gènes de tolérance herbicide, une cellule végétale et une plante tolérantes à plusieurs herbicides.

10 Dans la suite de la description, les herbicides seront désignés selon le nom commun en particulier référencé dans "The Pesticide Manual" 10 th edition par British Crop Protection Council.

15 On connaît des plantes qui ont été transformées pour être tolérantes à certains herbicides comme notamment les dihalogénohydroxybenzonitriles, en particulier le bromoxynil et l'ioxynil, grâce au gène codant pour la nitrilase dégradant ces herbicides ou encore celles tolérantes aux herbicides inhibiteurs de l'EPSPS notamment le glyphosate, le sulfosate ou la fosametine ou encore aux inhibiteurs de l'acétolactatesynthase (ALS) du type des sulfonylurées ou encore aux inhibiteurs de la dihydro-pierotate synthase tel que l'asulam ou encore aux inhibiteurs de la glutamine synthase tels que le glufosinate.

20 On connaît certains herbicides tels que les isoxazoles décrites notamment dans les demandes de brevets français 95 06800 and 95 13570 et notamment l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles tels que ceux décrits dans les demandes européennes 0 496 630, 0 496 631, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones décrites dans les demandes européennes 0 625 505 et 0 625 508, en particulier la sulcotrione ou encore celles décrites dans l'USP 5 506 195, ou encore les pyrazolinates. De plus le gène codant pour l'HPPD conférant une tolérance à ces derniers herbicides a été isolé et des plantes transgéniques le contenant obtenues montrant une tolérance significative et font l'objet des demandes françaises non publiées N°95/06800, 95/13570 et 96/05944.

25 Cependant la pratique agricole montre que les agriculteurs aiment disposer pour le traitement des plantes, et notamment des cultures, d'associations d'herbicides en particulier pour répondre à différents problèmes de désherbage dûs aux limites du spectre des herbicides pris isolément. Il peut être en outre intéressant de disposer d'un gène de 30 marquage de sélection associé à un gène de tolérance herbicide. Il y a donc un besoin de plantes et notamment de cultures présentant une tolérance à plusieurs herbicides, de préférence au moins deux ou trois .

Il a maintenant été découvert qu'on pouvait conférer à une cellule végétale et à une plante un tolérance herbicide multiple.

La présente invention a d'abord pour objet un gène chimère comprenant au moins deux gènes chimères élémentaires contenant chacun, dans le sens de la transcription, des éléments de régulation nécessaires à sa transcription dans les plantes c'est à dire au moins une séquence de régulation promotrice, au moins une partie codante hétérologue comprenant une séquence codante codant pour une enzyme conférant aux plantes la tolérance à un herbicide et au moins une séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation.

10 Comme séquence codante, on peut notamment utiliser toutes celles connues pour conférer la tolérance de plantes à certains inhibiteurs telles que:

- celle de l'EPSPS pour la tolérance au glyphosate, au sulfosate ou à la fosamétine, notamment celles de la protéine mutée ou non, on peut citer notamment les brevets:

- USP 4 535 060, EP 115 673, USP 4 769 061, USP 5 094 945; USP 4 971 908, USP 5

15 145 783. EP 293 358; EP 378 985, WO 91/04323; WO 92 044 449; WO 92 06201. Dans la suite ce type de gène sera désigné par séquence ou gène "EPSPS".

On peut également citer la glyphosate oxydoréductase (cf WO 92/ 000 377) enzyme de détoxification du glyphosate.

20 - celle du gène de la nitrilase de *Klebsiella sp.* pour la tolérance aux dihalogénobenzonitriles décrite dans l'USP 4 810 648 et en particulier celui issu de *Klebsiella ozaenae*, qui sera désigné dans la suite par gène ou séquence "OXY".

- celle de l'HPPD telle décrite dans les demandes françaises non publiées N°95/06800, 95/13570 et 96/05944 citées ci-dessus. Cette HPPD peut être de toute nature.

25 Plus particulièrement cette séquence peut être d'origine bactérienne, telle que notamment le genre *Pseudomonas* ou encore d'origine végétale, telle que notamment de plante monocotylédone ou dicotylédone, notamment d'*Arabidopsis* ou d'ombellifères comme par exemple la carotte (*Daucus carota*). Elle peut être native ou sauvage ou éventuellement mutée tout en gardant fondamentalement une propriété de tolérance herbicide contre les

30 inhibiteurs de l'HPPD, tels que les herbicides de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones ou des pyrazolinates.

D'autres séquences peuvent être utilisées:

- celle de la phosphinotrycine acétyl transférase ou celle de la glutamine synthase pour la tolérance au glufosinate (cf EP 0 242 236)

35 - celle de la dihydroptéroate synthase pour la tolérance à l'asulam (cf EP 0 369 367)

- celle de l'ALS pour la tolérance aux sulfonylurées

- celle de la Protoporphyrin oxydase ("protox") pour la tolérance aux herbicides de la famille des diphenylethers tels que l'acifluorfen ou l'oxyfluorfen ou celle des oxadiazoles tels que l'oxadiazon ou l'oxadiargyl ou celle des imides cycliques tels que le chlorophthalim ou celle des phénypyrazoles tel que le TNP ou celles des pyridines et les phénopylates et analogues carbamates (cf WO 95/34659).

5 De préférence l'un des gènes chimères contient une séquence codante de l'HPPD. Dans ce cas l'autre ou les autres séquences peuvent être quelconques et notamment choisies dans le groupe mentionné ci-dessus. De préférence les autres séquences sont choisies dans le groupe comprenant le gène de la nitrilase de tolérance aux dihalogénohydroxybenzonitriles
10 et un gène EPSPS.

15 Les gènes chimères selon l'invention peuvent en outre contenir des gènes codant pour des propriétés autres que de tolérance herbicides tels que par exemple des gènes de résistance aux insectes, tels que ceux de type *Bacillus thuringensis* conférant une résistance à divers représentants de la famille des coléoptères, des lépidoptères, ou encore des gènes de résistance aux nématodes, des gènes de résistance aux maladies fongiques ou microbiennes, ou encore des gènes conférant des propriétés agronomiques telles que les gènes des diverses desaturases intervenant dans la production des acides gras. On peut citer en particulier celui de la delta -6 desaturase décrit dans la demande internationale WO 93/06712.

20 Comme séquence de régulation promotrice on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO) ou de celui d'un gène de l'α tubuline (Demande européenne EP n° 0 652 286), ou encore d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du choux fleur (CaMV 19S ou 35S), mais tout promoteur convenable connu peut être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice
25 qui favorise la surexpression de la séquence codante, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande européenne EP 0507698.

30 Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription "enhancer", comme par exemple l'activateur de translation du virus etch du tabac (TEV) décrit dans la demande WO87/07644, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, constituée d'une partie de séquence de la partie mature N

terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande européenne n° 0 508 909.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos 5 d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande européenne EP n° 0 633 317.

L'invention a encore pour objet une cellule végétale, de plantes monocotylédones ou dicotylédones, notamment des cultures, tolérante à aux moins deux herbicides dont au moins un est un inhibiteur de l'HPPD. Cette cellule peut contenir au moins deux gènes chimères 10 comprenant chacun une séquence codant pour la tolérance à un herbicide et dont l'un comprend une séquence codant pour l'HPPD. Les deux gènes chimères peuvent être soit portés par un même vecteur, soit chacun sur un vecteur différent, soit encore apportés tels quels par introduction dans la cellule par des moyens physiques ou physico-chimiques, par exemple par microinjection, électroporation ou bombardement, selon des méthodes en soi connues. 15

L'invention a encore pour objet une plante transformée tolérante à au moins deux herbicides dont un est inhibiteur de l'HPPD. Cette plante peut être obtenue soit par croisement d'au moins deux plantes contenant chacune un gène codant pour la tolérance à un herbicide, soit par régénération d'une cellule selon l'invention, telle que décrite ci-dessus.

20 Les plantes peuvent être des monocotylédones ou dicotylédones, notamment des cultures, grandes cultures telles que par exemple mais de manière non limitative pour les dicotylédones le tabac, le coton, le colza, le soja, la betterave, et pour les monocotylédones le maïs et les céréales à paille, ou en core des cultures maraîchères ou florales.

25 L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention de plantes à tolérance herbicide multiple par trangénèse végétale, caractérisé en ce que:

- dans une première étape, on insère dans plusieurs cellules respectivement un des gènes élémentaires contenant chacun des éléments de régulation nécessaires à sa transcription dans les plantes et une séquence codante codant pour une enzyme conférant aux plantes la tolérance à un herbicide, et que

30 - ensuite les plantes sont croisées pour obtenir des plantes à tolérance multiple.

L'invention a encore pour objet un autre procédé d'obtention de plantes à tolérance herbicide multiple par trangénèse végétale, une première étape comportant l'intégration dans des cellules végétales d'au moins deux gènes de tolérances à un herbicide dont au moins un est un inhibiteur de l'HPPD, la seconde étape comprenant la régénération de la plante à partir des cellules transformées selon l'invention.

35 La transformation peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les demandes et brevets cités dans la présente demande.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules ou des protoplastes avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Selon l'invention ces ADN peuvent être portés par les mêmes particules ou par des bombardements différents. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène 5 chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation. L'homme de métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de la 10 plante, notamment de son caractère monocotylédone ou dicotylédone.

On a observé que des plantes transformées selon l'invention présentent une tolérance significative aux inhibiteurs de l'hydroxy phényl pyruvate dioxygénase tels que certains herbicides récents tels que les isoxazoles décrites notamment dans les demandes de brevets 15 français 9506800 and 95 13570 et notamment du 4-[4-CF₃-2-(méthylsulfonyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole, ou "isoxaflutole", herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles tels que ceux décrits dans les demandes européennes 0 496 630, 0 496 631, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-CF₃ phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂ CH₃-4-2,3 Cl₂ phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones décrites 20 dans les demandes européennes 0 625 505 et 0 625 508, en particulier la sulcotrione et les pyrazinolates. Ces mêmes plantes selon l'invention présentent une tolérance significative à d'autres herbicides tels que par exemple les dihalogéno benzonitriles, notamment le bromoxynil et l'ioxynil, le glyphosate et ses analogues, le glufosinate

La présente invention a encore pour objet les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépende de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les demandes ci-dessus. Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, chacun d'eux portant l'un des gènes de tolérance herbicide décrites.

L'invention a enfin pour objet un procédé de désherbage de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un herbicide de ce type, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide sur des plantes transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture. Par herbicide au sens de la présente invention on entend une matière active herbicide seule ou associée à un additif qui modifie son efficacité comme par exemple un agent augmentant l'activité (synergiste) ou limitant l'activité (en anglais safener).

35 Bien entendu, pour leur application pratique, les herbicides ci-dessus sont associée de manière en soi connue aux adjuvants de formulations utilisés habituellement en agrochimie

Selon l'invention l'un des gènes de tolérance herbicides présents dans les plantes peut être utilisé comme marqueur de sélection, soit in vitro, soit in vivo .

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Exemple 1: Isolement du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

5 A partir de la séquence en acides aminés de l'HPPD de *Pseudomonas sp.* P.J. 874 (publié par Rüetschi U. et al. 1992. Eur. J. Biochem. 205: 459-466), on déduit la séquence de différents oligonucléotides pour amplifier par PCR une partie de la séquence codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32 (isolée par McKellar, R.C. 1982. J. Appl Bacteriol. 53:305-316). Un fragment d'amplification du gène de cette HPPD a été utilisé pour cribler une 10 banque génomique partielle de *P. fluorescens* A32 et ainsi isoler le gène codant pour cette enzyme.

A) Préparation de l'ADN génomique de *P. fluorescens* A32.

La bactérie a été cultivée dans 40 ml de milieu minimum M63 (KH₂PO₄ 13,6g/l, (NH₄)₂SO₄ 2g/l, MgSO₄ 0,2g/l, FeSO₄ 0,005 g/l pH7 plus L-tyrosine 10mM comme seule 15 source de carbone) à 28°C pendant 48 heures.

Après lavage, les cellules sont reprises dans 1 ml de tampon de lyse (tris HCl 100 mM pH 8.3, NaCl 1,4 M et EDTA 10 mM) et incubées 10 minutes à 65°C. Après un traitement au phénol/chloroforme (24/1) et un traitement au chloroforme, les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol puis repris dans 300 µl d'eau stérile et traités à la RNase 10 µg/ml final. L'ADN est de nouveau traité au phénol/chloroforme, chloroforme et reprécipité par addition de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH5 et 2 volumes d'éthanol. L'ADN est ensuite repris dans de l'eau stérile et dosé.

B) Choix des oligonucléotides et synthèses:

25 A partir de la séquence en acides aminés de l'HPPD de *Pseudomonas sp.* P.J. 874 on choisit cinq oligonucléotides, deux dirigés dans le sens NH₂ terminal de la protéine vers le COOH terminal de la protéine et trois dirigés dans le sens inverse (voir figure 1). Le choix a été dicté par les deux règles suivantes:

30 -une extrémité 3' de l'oligonucléotide stable, c'est à dire au moins deux bases sans ambiguïté.
-une dégénérescence la plus faible possible.

Les oligonucléotides choisis ont les séquences suivantes:

P1: 5'TA(C/T)GA(G/A)AA(C/T)CCIA(TGGG)3'

P2: 5'GA(G/A)ACIGGICCIATGGA3'

P3: 5'AA(C/T)TGCATIA(G/A)(G/A)AA(C/T)TC(C/T)TC3'

P4: 5'AAIGCIAC(G/A)TG(C/T)TG(T/G/A)ATICC3'

P5: 5'GC(C/T)TT(A/G)AA(A/G)TTICC(C/T)TCICC3'

35 Ils ont été synthétisés sur le synthétiseur "Cyclone plus DNA Synthesizer" de marque MILLPORE.

Avec ces cinq oligonucléotides par PCR les fragments d'amplification que l'on doit obtenir théoriquement d'après la séquence SEQ ID N°1 ont les tailles suivantes:

avec les amorces P1 et P3 -----> environ 690 bp

avec les amorces P1 et P4 -----> environ 720 bp

5 avec les amorces P1 et P5 -----> environ 1000 bp

avec les amorces P2 et P3 -----> environ 390 bp

avec les amorces P2 et P4 -----> environ 420 bp

avec les amorces P2 et P5 -----> environ 700 bp

C) Amplification d'une partie codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

10 Les amplifications ont été faites sur un appareil PCR PERKIN ELMER 9600 et avec la Taq polymérase PERKIN ELMER avec son tampon dans les conditions standards, c'est à dire pour 50µl de réaction il y a les dNTP à 200µM, les primers à 20µM, la Taq polymérase 2,5 unités et l' ADN de *P. fluorescens* A32 2,5 µg.

15 Le programme d'amplification utilisé est, 5 min à 95°C puis 35 cycles <45 sec 95°C, 45 sec 49°C, 1 min 72°C> suivis de 5 min à 72°C.

Dans ces conditions, tous les fragments d'amplification obtenus ont une taille compatible avec les tailles théoriques données au-dessus, ce qui est une bonne indication de la spécificité des amplifications.

20 Les fragments d'amplifications obtenus avec les jeux d'amorces P1/P4, P1/P5 et P2/P4 sont ligués dans pBSII SK(-) après digestion de ce plasmide par Eco RV et traitement à la terminal transférase en présence de ddTTP comme décrit dans HOLTON T.A. and GRAHAM M.W. 1991. N.A.R. vol 19, n°5 p1156.

25 Un clone de chacun des trois types est séquencé partiellement; ceci permet de confirmer qu'on a bien amplifié dans les trois cas une partie de la région codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32. Le fragment P1/P4 est retenu comme sonde pour cibler une banque génomique partielle de *P. fluorescens* A32 et isoler le gène complet de l'HPPD.

D) Isolement du gène.

30 Par Southern on montre qu'un fragment de 7 Kbp après digestion de l'ADN de *P. fluorescens* A32 par l'enzyme de restriction BamHI s'hybride avec la sonde HPPD P1/P4. On a donc fait digérer 400µg d'ADN de *P. fluorescens* A32 par l'enzyme de restriction BamHI et purifier sur gel d'agarose les fragments d'ADN faisant environ 7Kbp.

35 Ces fragments sont ligués dans pBSII SK(-), lui-même digéré par Bam HI et déphosphorylé par traitement à la phosphatase alcaline. Après transformation dans *E. coli* DH10b, la banque génomique partielle est ciblée avec la sonde HPPD P1/P4.

Un clone positif a été isolé et appelé pRP A. Sa carte simplifiée est donnée figure 2. Sur cette carte est indiqué la position de la partie codante du gène HPPD. Elle est composée de 1077 nucléotides qui codent pour 358 acides aminés (voir SEQ ID N° 1). L'HPPD de *P.*

fluorescens A32 présente une bonne homologie en acides aminés avec celle de *Pseudomonas* sp. strain P.J. 874, il y a en effet 92% d'identité entre ces deux protéines (voir figure 3).

Exemple 2 : Construction de deux gènes chimères avec une séquence HPPD.

5 Pour conférer la tolérance de plantes aux herbicides inhibant l'HPPD, on construit deux gènes chimères:

10 Le premier consiste à mettre la partie codante du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32 sous le contrôle du promoteur double histone (Demande de Brevet européen N° 0 507 698) suivi du Tobacco etch virus translational enhancer (TEV) (pRTL-GUS (Carrington and Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597)) avec le terminateur du gène de la nopaline synthase. L'HPPD sera alors localisée dans le cytoplasme.

15 Le deuxième sera identique au premier, à ceci près qu'entre l'activateur de translation TEV et la partie codante de l'HPPD, on intercale le peptide de transit optimisé (OTP) (Demande européenne EP n° 0 508 909). L'HPPD sera alors localisée dans le chloroplaste.

15 A) Construction du vecteur pRPA-RD-153:

20 - pRPA-RD-11: Un dérivé de pBS-II SK(-) (Stratagene catalog #212206) contenant le site de polyadenylation de la nopaline synthase (NOS polyA) (Demande européenne n° 0 652 286) est cloné entre les sites *Kpn*I et *Sall*. Le site *Kpn*I est transformé en un site *Not*I par traitement avec la T4 ADN polymerase I en présence de 150 µM de deoxynucleotide triphosphates puis ligation avec un linker *Not*I (Stratagene catalog #1029). Ainsi on obtient une cassette de clonage NOS polyA.

25 - pRPA-RD-127: Un dérivé de pRPA-BL-466 (Demande européenne EP n° 0 337 899) cloné dans pRPA-RD-11 créant une cassette d'expression du gène *oxy* et contenant le promoteur de la petite sous unité de la ribulose-biscarboxylase:

25 "promoteur (SSU) - *oxy* gene - NOS polyA"

Pour créer ce plasmide, pRPA-BL-488 a été digéré avec *Xba*I et *Hind*III pour isoler un fragment de 1.9 kpb contenant le promoteur SSU et le gène *oxy*, qui a été ligué dans le plasmide pRPA-RD-11 digéré avec des enzymes compatibles.

30 - pRPA-RD-132: C'est un dérivé de pRPA-BL-488 (Demande européenne EP n° 0 507 698) cloné dans pRPA-RD-127 avec création d'une cassette d'expression du gène *oxy* avec le promoteur double histone:

" promoteur double histone - *oxy* gène - NOS polyA "

35 Pour fabriquer ce plasmide, pRPA-BL-466 est digéré par *Hind*III, traité par la Klenow puis redigéré avec *Nco*I. Le fragment de 1.35 kbp purifié contenant le promoteur double histone H3A748 est ligué avec le plasmide pRPA-RD-127 qui avait été digéré par *Xba*I, traité Klenow et redigéré par *Nco*I.

- pRPA-RD-153: C'est un dérivé de pRPA-RD-132 contenant l'activateur de translation du virus etch du tabac (TEV). pRTL-GUS (Carrington and Freed. 1990: J. Virol. 64: 1590-1597) est digéré avec *Ncol* et *EcoRI* et le fragment de 150 bp est ligué dans pRPA-RD-132 digéré avec les mêmes enzymes. Donc on a créé une cassette d'expression contenant le 5 promoteur:

"double histone promoteur - TEV -oxy u - NOS polyA"

B) Construction du vecteur pRPA-RD-185:

pUC19/GECA: Un dérivé de pUC-19 (Gibco catalog #15364-011) contenant de nombreux sites de clonage. pUC-19 est digéré avec *EcoRI* et ligué avec l'oligonucléotide 10 linker 1:

Linker 1: AATTGGGCCA GTCAGGCCGT TTAAACCCCTA GGGGGCCCG
CCCGGT CAGTCCGGCA AATTGGGAT CCCCCGGGC TTAA

Le clone sélectionné contient un site *EcoRI* suivi du polylinker qui contient les sites suivants: *EcoRI*, *Apal*, *AvrII*, *Pmel*, *Sfil*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI* et 15 *HindIII*.

pRPA-RD-185: c'est un dérivé de pUC19/GECA contenant un polylinker modifié. pUC19/GECA est digéré par *HindIII* et ligué avec l'oligonucléotide linker 2:

Linker 2: AGCTTTAAT TAAGGCGCGC CCTCGAGCCT GGTCAGGG
AAATTA ATTCCGCGCG GGAGCTCGGA CCAAGTCCC TCGA

20 Le clone sélectionné contient un site *HindIII* site au milieu du polylinker qui contient maintenant les sites suivants: *EcoRI*, *Apal*, *AvrII*, *Pmel*, *Sfil*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*, *PacI*, *AscI*, *XbaI* et *EcoNI*.

C) Construction du vecteur pRP T:

25 - pRP O: un dérivé de pRPA-RD-153 contenant une cassette d'expression de l'HPPD, promoteur double histone - TEV - gène HPPD - terminateur N_{os}. Pour fabriquer pRP O, pRPA-RD153 est digéré par *Hind III*, traité par la Klenow puis redigéré par *NcoI* pour enlever le gène *oxy* et le remplacer par le gène HPPD sorti du plasmide pRP A par digestion *BstEII*, traitement par la Klenow et redigestion par *NcoI*.

30 - pRP R: pour l'obtenir le plasmide pRP O a été digéré par *PvuII* et *SacI*, le gène chimère a été purifié puis ligué dans pRPA-RD-185 lui-même digéré par *PvuII* et *SacI*.

- pRP T: il a été obtenu par ligation du gène chimère sorti de pRP R après digestion par *SacI* et *HindIII* dans le plasmide pRPA-BL 150 alpha2 digéré par les mêmes enzymes (Demande européenne EP n° 0 508 909).

Le gène chimère du vecteur pRP T a donc la structure suivante:

Promoteur double histone	TEV	Région codante de l'HPPD	Terminateur nos
--------------------------	-----	--------------------------	-----------------

D) Construction du vecteur pRP V

5 - pRP P: c'est un dérivé de pRPA-RD-7 (Demande européenne EP n° 0 652 286) contenant le peptide de transit optimisé suivi du gène de l'HPPD. Il a été obtenu par ligation de la partie codante de l'HPPD sorti de pRP A par digestion BstEII et NcoI, traitement à la Klenow et du plasmide pRPA-RD-7 lui-même digéré SphI et Accl et traité à la DNase polymérase T4.

10 - pRP Q: un dérivé de pRPA-RD-153 contenant une cassette d'expression de l'HPPD, promoteur double histone - TEV - OTP - gène HPPD - terminateur Nos. Pour le construire le plasmide pRPA-RD-153 est digéré par Sal I, traité par la Klenow puis redigéré par NcoI pour enlever le gène oxy et le remplacer par le gène HPPD sorti du plasmide pRP P par digestion BstEII, traitement par la Klenow et redigestion par NcoI.

15 - pRP S: pour l'obtenir, le plasmide pRP Q a été digéré par PvuII et SacI pour sortir le gène chimère qui a été ligué dans pRPA-RD-185 lui-même digéré par PvuII et SacI.

- pRP V: il a été obtenu par ligation du gène chimère sorti de pRP S après digestion par SacI et HindIII dans le plasmide pRPA-BL 150 alpha2 (Demande européenne EP n° 0 508 909).

20 Le gène chimère du vecteur pRP Q a donc la structure suivante:

Promoteur double histone	TEV	OTP	Région codante de l'HPPD	Terminateur nos
--------------------------	-----	-----	--------------------------	-----------------

Exemple 3 : Transformation du tabac industriel PBD6.

25 Afin de déterminer l'efficacité de ces deux gènes chimériques, ceux-ci ont été transférés dans du tabac industriel PBD6 selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

1) Transformation:

30 Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium* EHA 101 (Hood et al,1987) porteuse du cosmid pTVK 291(Komari et al,1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh R. et al. (1985) *Science*, 227, 1229-1231.

2) Régénération:

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 100 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre ou in vitro et transformés selon la technique des disques foliaires (Science 5 1985, Vol 227, p.1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours. 10 Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre. Les plantes obtenues sont appelées Co 17.

15 Au sortir de l'in-vitro, les plantules de tabac transformées ont été acclimatées à la serre (60% d'humidité relative; température: 20°C la nuit et 23°C la jour) pendant cinq semaines puis traitées au 4-[4-CF3-2-(méthylsulfonyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.

20 Le tabac témoin, non transformé et traité au 4-[4-CF3-2-(méthylsulfonyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole à des doses allant de 50 à 400 g/ha, développe en environ 72 heures des chloroses, qui s'intensifient pour évoluer vers des nécroses très prononcées en une semaine (couvrant environ 80% des feuilles terminales).

Après transformation ce même tabac, qui surexprime l'HPPD de *P. fluorescens*, est très bien protégé contre un traitement au 4-[4-CF3-2-(méthylsulfonyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole à la dose de 400 g/ha.

25 Si l'enzyme surexprimée est dans le chloroplaste, c'est à dire si la transformation a été faite avec le gène porté par le vecteur pRP V, alors la plante est parfaitement protégée, ne présente aucun symptôme.

Exemple 4: Transformation du tabac industriel PBD6, avec gène EPSPS pour ⇒ construction 173

30 Isolement d'un ADNc codant pour une EPSPS de maïs:

Les différentes étapes, qui ont conduit à l'obtention de l'ADNc d'EPSPS de maïs, qui a servi de substrat à l'introduction des deux mutations, sont décrites ci-dessous. Toutes les opérations décrites ci-dessous sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce 35 choix n'a aucune incidence sur la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in

"Molecular Biology" Volumes 1 et 2. Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing Associates et Wiley -Interscience (1989)(Par la suite, les références à des protocoles décrits dans cet ouvrage seront notées "réf. CPMB"). Les opérations concernant l'ADN, qui ont été effectuées selon les protocoles décrits dans cet ouvrage sont, en particulier les suivantes:

5 ligation de fragments d'ADN, traitements par l'ADN polymérase de Klénow et la T4 ADN polymérase, préparation d'ADN de plasmides et de bactériophages λ soit en minipréparation soit en maxi préparation, analyses d'ADN et d'ARN respectivement selon les techniques de Southern et Northern. D'autres méthodes décrites dans cet ouvrage ont été suivies, et seules les modifications ou ajouts significatifs à ces protocoles ont été décrits ci-dessous.

10 A1. Obtention d'un fragment d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*

a) deux oligonucléotides 20-mers de séquences respectives:

5'- GCTCTGCTCATGTCTGCTCC -3'

5'- GCCCGCCCTTGACAAAGAAA- 3'

15 ont été synthétisés à partir de la séquence d'un gène d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* (Klee H.J. et al. (1987) Mol. Gen. Genet., 210, 437-442). Ces deux oligonucléotides sont respectivement en position 1523 à 1543 et 1737 à 1717 de la séquence publiée et en orientation convergente.

20 b) L'ADN total d'*Arabidopsis thaliana* (var. *columbia*) a été obtenu chez Clontech (référence catalogue: 6970-1)

c) On mélange 50 nanogrammes(ng) d'ADN avec 300ng de chacun des oligonucléotides et soumis à 35 cycles d'amplification avec un appareil Perkin-Elmer 9600, dans les conditions de milieu standard pour l'amplification préconisées par le fournisseur. Le fragment de 204 pb résultant constitue le fragment d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*.

25 2. Construction d'une bibliothèque d'un ADNc à partir d'une ligne cellulaire de maïs BMS .

a) On broye 5 g de cellules filtrées dans l'azote liquide et les acides nucléiques totaux extraits selon la méthode décrite par Shure et al. avec les modifications suivantes:

- le pH du tampon de lyse est ajusté à PH = 9,0;

-après la précipitation par l'isopropanol, le culot est repris dans l'eau et après

30 dissolution, ajusté à 2,5 M LiCl. Après incubation pendant 12 h à °C, le culot de la centrifugation d 15 min. à 30000g à 4°C est resolubilisé. L'étape de précipitation par LiCl est alors répétée. Le culot resolubilisé constitue la fraction ARN des acides nucléiques totaux.

35 b) La fraction ARN-polyA+ de la fraction ARN est obtenue par chromatographie sur colonne oligo-dT cellulose telle que décrite dans "Current Protocols in Molecular Biology".

c) Synthèse d'ADNc double brin à extrémité synthétique EcoRI: elle est réalisée en suivant le protocole du fournisseur des différents réactifs nécessaires à cette synthèse sous forme d'un kit: le "copy kit" de la société In Vitrogen.

Deux oligonucléotides simples brins et partiellement complémentaires de séquences respectives:

5'- AATTCCCCGGG -3'

5'- CCCGGG- 3' (ce dernier étant phosphorylé)

5 sont liqués avec les ADNc double brin à extrémités franches.

Cette ligation des adaptateurs résulte en la création de sites Sma I accolés aux ADNc double brin et EcoRI sous forme cohésive à chaque extrémité des ADNc double brin.

d) Création de la bibliothèque:

10 Les ADNc présentant à leurs extrémités les sites artificiels cohésifs EcoRI sont liqués avec le ADNc du bactériophage λ gt10 coupé par EcoRI et déphosphorylé selon le protocole du fournisseur New England Biolabs.

15 Une aliquote de la réaction de ligation a été encapsidée *in vitro* avec des extraits d'encapsidation: Gigapack Gold selon les instructions du fournisseur, cette librairie a été titrée en utilisant la bactéries *E.coli* C600 hfl . la librairie ainsi obtenue est amplifiée et stockée selon les instructions du même fournisseur et constitue la librairie de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS.

3. Criblage de la bibliothèque de ADNc de suspension cellulaire de maïs BMS avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*:

20 Le protocole suivi est celui de "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al , publiés par Greene Publishing Associates et S (1989)(CPMB). En bref, environ 10^6 phages recombinants sont étalés sur boîte LB à une densité moyenne de 100 phages /cm². Les plages de lyses sont répliqués en doubles sur membrane Hybond N d'Amersham.

25 h) L'ADN a été fixé sur les filtres par traitement UV 1600kJ (Stratalinker de Stratagene). Les filtres sont été préhybridés dans: 6xSSC/0,1%SDS/0,25 lait écrémé pendant 2h à 65°C. La sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été marquée au ³²P-dCTP par "random-priming" selon les instructions du fournisseur (Kit Ready to Go de Pharmacia). L'activité spécifique obtenue est de l'ordre de 10^8 cpm par μ g de fragment. Après dénaturation pendant 5 min à 100°C, la sonde est ajoutée dans le milieu de préhybridation et l'hybridation est poursuivie pendant 14 heures à 55°C. Les filtres sont fluorographiés 48h à -80°C avec un film Kodak XAR5 et des écrans renforçateurs Hyperscreen RPN d'Amersham. L'alignement des spots positifs sur le filtre avec les boîtes d'où ils sont issus permet de prélever, sur la boîte, des zones correspondant aux phages présentant une réponse d'hybridation positive avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Cette étape d'étalement, 30 transfert, hybridation, récupération est répétée jusqu'à ce que tous les spots de la boîte des phages successivement purifiés se révèlent positifs à 100% en hybridation. Une plage de lyse par phage indépendant est alors prélevée dans du milieu λ diluant (Tris-Cl pH= 7,5; MgSO₄

10mM; NaCl 0.1M; gélatine 0.1%). ces phages en solution constituant les clones positifs de l' EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

4. Préparation et analyse de l'ADN des clones d'EPSPS de la suspension cellulaire de maïs BMS.

5 On ajoute environ 5.10^8 phages à 20 ml de bactéries C600hfl à 2 OD 600nm/ml et incubés 15 minutes à 37°C. Cette suspension est alors diluée dans 200ml de milieu de croissance des bactéries dans un Erlen de 1l et agitée dans un agitateur rotatif à 250 rpm. La lyse est constatée par clarification du milieu, correspondant à 1 lyse des bactéries turbides et se produit après environ 4 h d'agitation. Ce surnageant est alors traité comme décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN obtenu correspond aux clones d'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS.

10 Un à deux μ g de cet ADN sont coupés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l' ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*.

15 Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone présentant un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* et contenant le plus long fragment EcoRI a une taille estimée sur gel à environ 1,7kpb.

20 5. Obtention du clone pRPA-ML-711:

Dix μ g de l'ADN du clone phagique contenant l'insert de 1,7kpb sont digérés par EcoRI et séparés sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert de 1,7kpb est excisé du gel par coloration BET et le fragment est traité à la β -agarase

25 selon le protocole du fournisseur New a Biolabs. L'ADN purifié du fragment de 1,7kpb est ligué à 12°C pendant 14h avec l'ADN du plasmide pUC 19 (New England Biolabs) coupé par EcoRI selon le protocole de ligation décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Deux μ l du mélange de ligation ci-dessus sont utilisés pour la transformation d'une

30 aliquote d'*E.coli* DH10B électro compétentes; la transformation se fait par électroporation en utilisant les conditions suivantes: le mélange de bactéries compétentes et de milieu de ligation est introduit dans une cuvette d'électroporation d'épaisseur 0,2 cm (Biorad) préalablement refroidie à 0°C. Les conditions physiques de l'électroporation utilisant un

35 électroporateur de marque Biorad sont 2500 Volts, 25 μ Farad et 200 Ω . Dans ces conditions, le temps de décharge moyen de condensateur est de l'ordre de 4,2 millisecondes. Les bactéries sont alors reprises dans 1 ml de milieu SOC (réf. CPMB) et agitées pendant 1

heure à 200 rpm sur un agitateur rotatif dans des tubes Corning de 15 ml. Après étalement sur milieu LB/agar supplémenté à 100 μ g/ml de carbénicilin, les mini-préparations des clones bactériens ayant poussé après une nuit à 37 °C est réalisée selon le protocole décrit

5 dans "Current Protocols in Molecular Biology". Après digestion par EcoRI de l'ADN et séparation en électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) à 0.8%, les clones présentant un insert de 1.7 kpb sont conservés. Une dernière vérification consiste à s'assurer que l'ADN purifié présente bien un signal d'hybridation avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*. Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont transférés sur membrane Hybond N d'Amersham selon le protocole de Southern décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". Le filtre est hybridé avec la sonde EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* selon les conditions décrites au paragraphe 3 ci-dessus. Le clone plasmidique présentant un insert de 1.7 kpb et hybridant avec la sondé EPSPS d'*Arabidopsis thaliana* a été préparé à plus grande 10 échelle et l'ADN résultant de la lyse des bactéries purifié sur gradient de CsCl ainsi que décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology". L'ADN purifié a été partiellement séquencé avec un kit Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant comme amores, les amores universelles de M13 directes et inverses commandées chez le même fournisseur. La séquence partielle réalisée couvre environ 0.5 kpb. La séquence 15 dérivée en acides aminés dans la région de la protéine mature (environ 50 résidus acides aminés) présente une identité de 100% avec la séquence aminée correspondante de l'EPSPS mature de maïs décrite dans le brevet américain USP 4 971 908). Ce clone correspondant à un fragment EcoRI de 1.7 kpb de l'ADN de l'EPSP de la suspension cellulaire de maïs BMS a été nommé pRPA-ML-711. La séquence complète de ce clone a été réalisée sur les deux 20 brins en utilisant le protocole du kit Pharmacia et en synthétisant des oligonucléotides complémentaires et de direction opposée tous les 250 pb environ. La séquence complète de ce clone de 1713 pb obtenue est présentée par SEQ ID N° 2.

6. Obtention du clone pRPA-ML-715:

25 L'analyse de la séquence du clone pRPA-ML-711 et en particulier la comparaison de la séquence d'acides aminés dérivés avec celle de maïs montre une extension de séquence de 92 pb en amont du codon GCG codant pour l'Alanine NH2-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908). De même une extension de 288 pb en 30 aval du codon AAT codant pour l'asparagine COOH-terminale de la partie mature de l'EPSPS de maïs (brevet américain USP 4 971 908) est observée. Ces deux parties pourraient correspondre, pour l'extension NH2-terminale à une portion de la séquence d'un peptide de transit pour la localisation plastidiale et pour l'extension COOH-terminale à la région 3' non traduite de l'ADNc.

Afin d'obtenir un ADNc codant pour la partie mature de l'ADNc de l'EPSPS de maïs, telle que décrite dans l'USP 4 971 908, les opérations suivantes ont été réalisées:

35 a) Elimination de la région 3' non traduite: construction de pRPA-ML-712:

Le clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction AseI et les extrémités résultant de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I selon le protocole décrit dans CPMB. Une coupure par l'enzyme de

restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces opérations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 1%.

Le fragment de gel contenant l'insert "Asel-extrémités franches/SacII" de 0,4 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. L'ADN du clone pRPA-ML-711 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII située dans le polylinker du vecteur de clonage pUC19 et les extrémités résultant de cette coupure ont été rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacII a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,7%.

Le fragment de gel contenant l'insert HindIII-extrémités franches/SacII de environ 3,7 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus.

Les deux inserts ont été ligués, et 2 µl du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DHIOB ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5.

On analyse le contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite pour pRPA-ML-711. Un des clones plasmidique retenu contient un insert EcoRI-HindIII de 1,45 kpb environ. La séquence des extrémités terminales de ce clone révèle que l'extrémité 5' de l'insert correspond exactement à l'extrémité correspondante de pRPA-ML-711 et que l'extrémité 3' terminale présente la séquence suivante:

" 5'...AATTAAGCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT-3' ".

La séquence soulignée correspond au codon de l'acide aminé COOH-terminal asparagine, le codon suivant correspondant au codon stop de la traduction. Les nucléotides en aval correspondent à des éléments de séquence du polylinker de pUC19. Ce clone comprenant la séquence de pRPA-ML-711 jusqu'au site de terminaison de la traduction de l'EPSPS mature de maïs et suivie de séquences du polylinker de pUC 19 jusqu'au site HindIII a été nommé pRPA-ML-712.

b) Modification de l'extrémité 5' de pRPA-ML-712: construction de pRPA-ML-715

Le clone pRPA-ML-712 a été coupé par les enzymes de restrictions PstI et HindIII. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert PstI/EcoRI de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence de quantité équimoléculaire de chacun des deux oligonucléotides partiellement complémentaires, de séquence:

Oligo1: 5'-GAGCCGAGCTCCATGGCCGGCGCCGAGGAGATCGTGCTGCA-3'

Oligo 2: 5'-GCACGATCTCCTCGGCGCCGGCATGGAGCTGGCTC-3'

ainsi qu'en présence d'ADN du plasmide pUC19 digéré par les enzymes de restrictions BamHI et HindIII.

Deux μ l du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DHIOB ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au paragraphe 5, un des clones présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence 5 de l'extrémité 5' terminale du clone retenu révèle que la séquence ADN dans cette région est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à BamHI, suivi de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage, suivi du reste de la séquence présente dans pRPAML-712. Ce clone a été nommé pRPA-ML-713. Ce clone présente un codon methionine ATG inclus dans un site NcoI en amont du codon Alanine N-terminal de l'EPSPSynthase mature. De plus, les codons alanine et glycine de l'extrémité N-terminale ont été conservées, mais modifiées sur la troisième base variable : GCGGGT initial donne GCCGGC modifié.

Le clone pRPA-ML-713 a été coupé par l'enzyme de restriction HindIII et les extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de la ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. L'ADN résultant de ces manipulations a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose LGTA/TBE (réf. CPMB) 0,8%. Le fragment de gel contenant l'insert "HindIII-extrémités franches/SacI" de 1,3 kpb a été excisé du gel et purifié selon le protocole décrit au paragraphe 5 ci-dessus. Cet insert a été mis en ligation en présence d'ADN du plasmide 20 pUC19 digéré par l'enzyme de restriction XbaI et les extrémités de cette coupure rendues franches par traitement avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I. Une coupure par l'enzyme de restriction SacI a ensuite été effectuée. Deux μ l du mélange de ligation ont servi à transformer *E. coli* DHIOB ainsi que décrit plus haut au paragraphe 5. Après analyse du contenu en ADN plasmidique de différents clones selon la procédure décrite ci-dessus au 25 paragraphe 5, un des clones présentant un insert d'environ 1,3 kpb a été conservé pour analyses ultérieures. La séquence des extrémités terminales du clone retenu révèle que la séquence ADN est la suivante: séquence du polylinker de pUC19 des sites EcoRI à SacI, suivie de la séquence des oligonucléotides utilisés lors du clonage délestée des 4 pb GATCC de l'oligonucléotide 1 décrit ci-dessus, suivi du reste de la séquence présente dans pRPA-30 ML-712 jusqu'au site HindIII et séquence du polylinker de pUC19 de XbaI à HindIII. Ce clone a été nommé pRPA-ML-715.

7) Obtention d'un ADNc codant pour une EPSPS de maïs mutée

Toutes les étapes de mutagénèse ont été réalisées avec le U.S.E. mutagenesis kit de 35 Pharmacia en suivant les instructions du fournisseur. Le principe de ce système de mutagénèse est le suivant: l'ADN plasmidique est dénaturé par la chaleur et réassocié en présence d'un excès molaire d'une part de l'oligonucléotide de mutagénèse, et d'autre part d'un oligonucléotide permettant d'éliminer un site d'enzyme de restriction unique présent

5 dans le polylinker. Après l'étape de réassociation, la synthèse du brin complémentaire est réalisée par l'action de la T4 ADN polymérase en présence de T4 ADN ligase et de protéine du gène 32 dans un tampon approprié fourni. Le produit de synthèse est incubé en présence de l'enzyme de restriction, dont le site est supposé avoir disparu par mutagénèse. La souche d'*E. coli* présentant, en particulier, la mutation *mutS* est utilisée comme hôte pour la transformation de cet ADN. Après croissance en milieu liquide, l'ADN plasmidique total est préparé, incubé en présence de l'enzyme de restriction utilisée précédemment. Après ces traitements, la souche d'*E. coli* DH10B est utilisée comme hôte pour la transformation. L'ADN plasmidique des clones isolés est préparé et la présence de la mutation introduite vérifiée par séquençage.

10

A)- modifications de sites ou de séquence sans incidence a priori sur le caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase: élimination d'un site NcoI interne de pRPA-ML-715.

15 La séquence de pRPA-ML-715 est numérotée arbitrairement en plaçant la première base du codon Alanine N-terminal GCC en position 1. Cette séquence présente un site NcoI en position 1217. L'oligonucléotide de modification du site présente la séquence :

5'-CCACAGGATGGCGATGGCCTTCTCC-3'.

20 Après séquençage selon les références données ci-dessus, la séquence lue après mutagénèse correspond à celle de l'oligonucléotide utilisé. Le site NcoI a bien été éliminé et la traduction en acides aminés dans cette région conserve la séquence initiale présente sur pRPA-ML-715.

Ce clone a été nommé pRPA-ML-716.

La séquence de 1340 bp de ce clone est présentée SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4.

25 B) modifications de séquence permettant l'augmentation du caractère de résistance de l'EPSPS de maïs aux produits inhibiteurs compétitifs de l'activité EPSP synthase.

Les oligonucléotides suivants ont été utilisés :

a) mutation Thr 102 → Ile.

5'-GAATGCTGGAATCGCAATGCGGCCATTGACAGC-3'

b) mutation Pro 106 → Ser.

30 5'-GAATGCTGGAATCGCAATGCGGTCTTGACAGC-3'

c) mutations Gly 101 → Ala et Thr 102 → Ile.

5'-CTTGGGGAATGCTGCCATCGCAATGCGGCCATTG-3'

d) mutations Thr 102 → Ile et Pro 106 → Ser.

35 5'-GGGGAATGCTGGAATCGCAATGCGGTCTTGACAGC-3'

Après séquençage, la séquence lue après mutagénèse sur les trois fragments mutés est identique à la séquence de l'ADN parental pRPA-ML-716 à l'exception de la région mutagénéisée qui correspond à celle des oligonucléotides de mutagénèse utilisés. Ces clones

ont été nommés : pRPA-ML-717 pour la mutation Thr 102 → Ile, pRPA-ML-718 pour la mutation Pro 106 → Ser, pRPA-ML-719 pour les mutations Gly 101 → Ala et Thr 102 → Ile et pRPA-ML-720 pour les mutations Thr 102 → Ile et Pro 106 → Ser.

La séquence de 1340 bp de pRPA-ML-720 est présentée SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6.

5

L'insert *NcoI-HindIII* de 1395 pb est à la base de toutes les constructions utilisées pour la transformation des plantes pour l'introduction de la résistance aux herbicides inhibiteurs compétitifs de l'EPSPS et en particulier la résistance au glyphosate. Cet insert sera nommé dans la suite des descriptions "le double mutant de l'EPSPS de maïs".

10 B Tolérance au glyphosate des différents mutants *in vitro*.

2.a: Extraction de l'EPSP synthase.

Les différents gènes d'EPSP synthases sont introduits sous forme d'une cassette *NcoI-HindIII* dans le vecteur plasmidique pTrc99a (Pharmacia, ref : 27-5007-01) coupé par *NcoI* et *HindIII*. Les *E. coli* DH10B recombinantes surexprimant les différents EPSP synthases sont 15 soniquées dans 40 ml de tampon par 10 g de cellules culottées et lavées avec ce même tampon (tris HCl 200 mM pH 7,8, mercaptoéthanol 50 mM, EDTA 5 mM et PMSF 1 mM), auxquels on ajoute 1 g de polyvinylpyrrolidone. La suspension est agitée pendant 15 minutes à 4°C, puis centrifugée 20 minutes à 27000g et 4°C.

Le surnageant est additionné de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 40% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé 20 minutes à 27000g et 4°C.

Le nouveau surnageant est additionné de sulfate d'ammonium pour amener la solution à 70% de la saturation en sulfate d'ammonium. Le mélange est centrifugé 30 minutes à 27000g et 4°C. L'EPSP synthase, présente dans ce culot protéique, est reprise dans 1 ml de tampon (tris HCl 20 mM pH 7,8 et mercaptoéthanol 50 mM). Cette solution est dialysée une nuit contre 25 deux litres de ce même tampon à 4°C.

2.b: Activité enzymatique.

L'activité de chaque enzyme ainsi que sa résistance au glyphosate est mesurée *in vitro* sur 10 minutes à 37°C dans le mélange réactionnel suivant: acide maléique 100 mM pH 5,6, phosphoénol pyruvate 1 mM, shikimate-3-phosphate 3 mM (préparé selon Knowles P.F. et Sprinson D.B. 1970. Methods in Enzymol 17A, 351-352 à partir de *Aerobacter aerogenes* strain ATCC 25597) et fluorure de potassium 10 mM. L'extrait enzymatique est ajouté au dernier moment après l'addition de glyphosate dont la concentration finale varie de 0 à 20 mM.

30 L'activité est mesurée par dosage du phosphate libéré selon la technique de Tausky H.A. et Shorr E. 1953. J. Biol. Chem. 202, 675-685.

35 Dans ces conditions, l'enzyme sauvage (WT) est inhibée à 85% dès la concentration de 0,12 mM de glyphosate. A cette concentration, l'enzyme mutante connue Ser106 n'est inhibée

qu'à 50% et les trois autres mutants Ile102, Ile102/Ser106, Ala101/Ile102 ne sont pas ou peu inhibées.

Il faut multiplier la concentration de glyphosate par dix, soit 1,2 mM, pour inhiber l'enzyme mutante Ile102 à 50%, les mutants Ile102/Ser106, Ala/Ile et Ala n'étant toujours pas inhibés.

5 Il faut noter que l'activité des mutants Ala/Ile et Ala n'est pas inhibée jusqu'à des concentrations de 10 mM de glyphosate, et que celle du mutant Ile102/Ser106 n'est pas réduite même si la concentration en glyphosate est multipliée par 2, soit 20 mM.

C

Résistance des plantes de tabac transformés.

10 0-1 Constructions des plasmides:

pRPA-RD-124: Addition d'un signal de polyadénylation "nos" à pRPA-ML-720, obtenu précédemment, avec création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS double mutant de maïs (Thr 102 → Ile et Pro 106 → Ser). pRPA-ML-720 est digéré avec Hind III, traité avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* pour produire une extrémité franche. On effectue une seconde digestion avec Nco I et le fragment EPSPS est purifié. Le gène EPSPS est ensuite ligué avec pRPA-RD-12 purifié (une cassette de clonage contenant le signal de polyadénylation de la nopaline synthase) pour donner pRPA-RD-124. Pour obtenir le vecteur pRPA-RD-12 purifié utile, il a fallu que celui-ci soit préalablement digéré par SalI, traité avec l'ADN polymérase de Klenow, puis digéré une 20 seconde fois avec NcoI.

pRPA-RD-125: Addition d'un peptide de transit optimisé (OTP) à pRPA-RD-124 avec création d'une cassette de clonage contenant le gène d'EPSPS ciblé sur les plasmides.

pRPA-RD-7 (demande de brevet européen EP 652 286) est digéré avec Sph I, traité avec la T4 ADN polymérase, puis digéré avec Spe I et le fragment OTP est purifié. Ce fragment 25 OTP est cloné dans pRPA-RD-124 qui a été préalablement digérée par NcoI, traité avec l'ADN polymérase de Klenow pour enlever la partie protubérante 3', puis digérée par Spe I. Ce clone est alors séquencé pour assurer la fusion traductionnelle correcte entre le OTP et le gène d'EPSPS. On obtient alors pRPA-RD-125.

pRPA-RD-159: Addition du promoteur double d'histone d'*arabidopsis* H4A748 (demande de brevet EP 507 698) à pRPA-RD-125 avec création d'une cassette pour expression dans les plantes pour l'expression du gène "OTP- gène d'EPSPS double mutant" dans les tissus de dicotylédones. pRPA-RD-132 (une cassette contenant le promoteur double H4A748 (demande de brevet EP 507 698)) est digérée avec Nco I et Sac I. Le fragment purifié du promoteur est ensuite cloné dans qui a été digéré avec Eco I et Sac I.

35 pRPA-RD-173: Addition du gène "promoteur H4A748-OTP-gène d'EPSPS double mutant" de pRPA-RD-159 dans plasmide pRPA-BL-150A (demande de brevet européen 508 909) avec création d'un vecteur de transformation *Agrobacterium tumefaciens*. pRPA-

RD-159 est digéré avec Not I et traité avec la polymérase de Klenow. Ce fragment est ensuite cloné dans pRPA-BL-150A avec Sma I.

1-1- Transformation.

5 Le vecteur pRPA-RD-173 est introduit dans la souche *d'Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood et al.,1987) porteuse du cosmid pTVK291 (Komari et al.,1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al.(1985).

1-2- Régénération.

10 La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et transformées selon la technique des disques foliaires (Science,1985.Vol 227,p.1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30g/l de saccharose contenant 0,05 mg/l 15 d'acide naphtylacétique (ANA) et 2mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas 20 d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

1-3- Résistance au glyphosate.

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction pRPA-RD-173. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec une suspension acqueuse de RoundUp correspondant à 0.8kg de matière active glyphosate par hectare.

25 Les résultats correspondent à l'observation d'indices de phytotoxicité relevés 3 semaine après traitement. Dans ces conditions, on constate que les plantes transformées par la construction pRPA-RD-173 présentent une très bonne tolérance alors que les plantes témoins non transformées sont complètement détruites.

30 Ces résultats montrent clairement l'amélioration apportée par l'utilisation d'un gène chimère selon l'invention pour un même gène codant pour la tolérance au glyphosate.

Exemple 5: Transformation du tabac industriel PBD6, avec gène de la nijilase (pour ⇒ construction 238):

35 Ce tabac est obtenu selon l'enseignement de la demande européenne n° 0 337 899 page 6 ligne 50 et suivantes à partir de la construction 238, qui est celle décrite sous le nom de pRPA-BL 238.

Exemple 6: Croisement par pollinisation

On procède par pollinisation en serre au croisement respectivement des lignées Co 17, 173 et 238 :

- Co 17 avec 238 pour obtenir des plantes de tabac PBD6 à tester sur la double tolérance à l'isoxaflutole et au bromoxynil (" plantes HPPD + OXY") et
- 5 - Co 17 avec 173 pour obtenir des plantes de tabac PBD6 à tester sur la double tolérance à l'isoxaflutole et au glyphosate (" plantes HPPD + EPSPS").

Les trois lignées sont homozygotes vis à vis du gène concerné: en conséquence la descendance est hemizygote pour chacun des deux gènes introduits par croisement.

10 Les plantes croisées sont obtenues au bout de six semaines.

Exemple 7: Mesure de la tolérance du tabac en traitement de postlevée avec l'isoxaflutole et de postlevée avec le bromoxynil ou le glyphosate.

15 Dans cet essai, chaque test est effectué sur un échantillon de 10 plantes, 10 plantes étant gardées non traitées.

Tous les traitements sont effectués par pulvérisation à raison de 500l de bouillie par hectare.

Pour le traitement en postlevée, on fait un semis puis on repique les plantes en godets de 9cm x 9cm.

20 Les traitements de post levée sont faits à un stade bien développé (3-4 feuilles) Des lots de plantes respectivement sauvage et génétiquement transformées obtenues ci-dessus sont répartis en plusieurs parts, avec:

a) un lot non traité,

b) d'autres lots qui sont traités respectivement avec un herbicide seul,

25 - de l'isoxaflutole en post levée, à deux doses (respectivement 200 et 400 g/ha) ,
- du bromoxynil en post levée à deux doses (respectivement 400 et 800 g/ha),
- du glyphosate en post levée à deux doses (respectivement 800 et 1200 g/ha),

c) d'autres lots qui sont traités respectivement avec deux herbicides, en post levée, en mélange extemporané:

30 - de l'isoxaflutole et du bromoxynil à deux doses (respectivement 200/400 et 400/800 g/ha)
- de l'isoxaflutole et du glyphosate à deux doses (respectivement 200/800 et 400/1200 g/ha).

Les traitements sont effectués avec les formulations suivantes: isoxaflutole à 75%, le bromoxynil (produit commercial PARDNER) sous forme octanoate en concentré émulsionnable à 225g/l et le glyphosate (Round-UP)

Dans ces conditions, on observe 17 jours après le traitement les phytotoxicités suivantes, exprimées en pourcentage de destruction indiquées dans le tableau suivant, ainsi que le nombre de plantes par lot et les doses d'herbicide(s) exprimées en gramme de matière active par hectare:

10 Traitements de postlevée avec l'isoxaflutole
et de postlevée avec le bromoxynil ou le glyphosate

Herbicide en g/l	Plantes avec gène de tolérance					SANS = Sauvage
	*	HPPD + OXY	*	HPPD + EPSPS	*	
Contrôles	10		10		10	
isoxaflutole seul	200	20	4%	20	2%	10
	400	20	5%	20	3%	10
bromoxynil seul	400	10	3%			0%
	800	10	0%			0%
Glyphosate seul	800			20	0%	10
	1200			20	0%	10
Isoxaflutole + bromoxynil	200	20	20%			10
	400					100%
Isoxaflutole + bromoxynil	400	20	30%			10
	800					100%
Isoxaflutole + glyphosate	200			40	5%	10
	800					100%
Isoxaflutole + glyphosate	400			40	10%	10
	1200					100%

15 * nombre de plants

Exemple 8

Dans le but d'étudier si le gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* peut être utilisé comme gène marqueur au cours du cycle "transformation - régénération" d'une espèce végétale, le tabac a été transformé avec le gène chimère composé du gène de l'HPPD et du gène EPSPS doublement muté de résistance au glyphosate et des plantes transformées

résistantes à la fois à l'isoxaflutole et au glyphosate ont été obtenues après sélection sur isoxaflutole.

Matériel et méthodes et résultats

5 Le gène chimérique pRP 2012 décrit ci-dessous est transféré dans du tabac industriel PBD6 selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

Le gène chimère du vecteur pRP 2012 a la structure A-B suivante, dans laquelle:

A est:

10

Promoteur double histone	TEV	OTP	Région codante de l'HPPD	Terminateur nos
--------------------------	-----	-----	--------------------------	-----------------

et B est :

Promoteur double histone	TEV	OTP	Région codante de l'EPSPS	Terminateur nos
--------------------------	-----	-----	---------------------------	-----------------

comme celui utilisé dans le vecteur pRPA-RD-173

Le gène chimère pRP 2012 est introduit dans le tabac.

15 1) Transformation:

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium* EHA 101(Hood et al,1987) porteuse du cosmide pTVK 291(Komari et al,1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al(1985).

20 2) Régénération:

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 350 mg/l de cefotaxime et 1 mg/l d'isoxaflutole. Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre ou in vitro et transformés selon la technique des disques foliaires (Science 1985,Vol 227,p.1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours et 1 mg/l d'isoxaflutole. Les pousses vertes formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose et 1 mg/l d'isoxaflutole mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours. Puis on prélève des

pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et 1 mg/l d'isoxaflutole et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

5 Toutes les plantules obtenues selon ce protocole sont analysées par PCR avec des amorces spécifiques de l'HPPD de *P. fluorescens*. Cette analyse PCR a permis de confirmer que toutes les plantules ainsi obtenues ont bien intégré le gène de l'HPPD et qu'elles sont tolérantes à la fois à l'isoxaflutole et au glyphosate, dans les conditions décrites à l'exemple 7.

10 En conclusion, cet essai confirme que le gène de l'HPPD peut être utilisé comme gène marqueur et que, associé à ce gène, l'isoxaflutole peut être un bon agent de sélection.

Exemple 9: Plante avec un gène HPPD et un gène bar, résistant à la fois à l'isoxaflutole et à la phosphinothricine.

15 1. Construction d'un gène chimère avec une séquence HPPD:
Le plasmide pRPA-RD-1004 représenté à la figure 4 est obtenu par insertion du gène chimère de résistance aux isoxazoles dans le plasmide pUC 19 de 2686 pb, commercialisé par New England Biolabs (Yannish-Perron, C. Viera, J. and Massing, J. (1985) Gene 33, 103-119 et contenant la résistance à l'ampicilline.

20 20 Les différents éléments du gène chimère sont, dans le sens de la traduction:
- le promoteur histone H3C4 de maïs de 1020pb décrit dans la demande EP 0 507 698;
- l'intron du gène de l'alcool déshydrogénase 1 de maïs décrit par Sachs M *et al.*
Genetics 113: 449-467 (1986) et constitué de 536pb
- le peptide de transit optimisé (OTP) décrit dans la demande de brevet EP 0 508 909; cet
25 OTP est constitué des 171 pb du peptide de transit de la petite sous unité de la Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase /oxygénase d'*Helianthus annuus* (Waksman G. *et al* 1987. *Nucleic acids Res.* 15: 7181) suivies des 66 pb de la partie mature de la petite sous unité de la Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase /oxygénase de *Zea mays* (Lebrun *et al* 1987. *Nucleic acids Res.* 15: 4360) elles mêmes suivies des 150 pb du peptide de transit de la petite sous unité de la Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/ oxygénase de *Zea mays* (Lebrun *et al* 1987. *Nucleic acids Res.* 15: 4360); L'ensemble fait donc 387 pb;
30 - la région codante de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* décrite ci-dessus;
- le terminateur du gène de la nopaline synthase (nos) (zone de polyadenylation du gène nos isolé de pTi 37, 250 pb (Bevan M. *et al.* *Nucleic Acids Res.* 11: 369-385);

35 2. construction d'un gène chimère de tolérance à la phosphinothricine (gène bar):
La phosphinothricine acetyl transferase (PAT) codée par le gène bar est une enzyme qui inactive un herbicide, la phosphinothricine (PPT). La PPT inhibe la synthèse de

glutamine et provoque une accumulation rapide d'ammoniaque dans les cellules conduisant à leur mort (Tachibana *et al.* 1986).

Le plasmide utilisé pour introduire la tolérance à la phosphinothricine comme agent de sélection est obtenu par insertion du gène chimère pDM 302 dans le vecteur pSP72 de 5 2462 pb, commercialisé par Promega Corp. (Genbank/ DDBJ database accession number X65332) et contenant le gène de résistance à l'ampicilline.

Le plasmide pDM 302 de 4700pb a été décrit par Cao, J., *et al.* Plant Cell Report 11: 586-591 (1992).

10 Les différents éléments de ce plasmide sont:

- le promoteur du gène actine de riz décrit par Mc Elroy D. *et al.* Plant Molecular Biology 15: 257-268 (1990) constitué de 840 pb;
- le premier exon du gène actine de riz constitué de 80 pb;
- le premier intron du gène actine de riz constitué de 450 pb; - la région codante du gène *bar* de 600 pb excisée du plasmide pIJ41404 décrit par White J. *et al.* Nuc. Acids Res. 18: 15 1862 (1990);
- le terminateur du gène de la nopaline synthase (*nos*) (zone de polyadenylation du gène *nos* isolé de pTi 37, 250 pb (Bevan M. *et al.* Nucleic Acids Res. 11: 369-385).

20 3. transformation:

La technique du bombardement est utilisée pour introduire la construction génétique. Les plasmides sont purifiés sur colonne Qiagen et coprécipités sur particules de tungstène M10 selon le procédé Klein (Nature 327: 70-73, 1987).

Une mixture (?) de particules métalliques et des deux plasmides décrits ci-dessus est ensuite

25 n

bombardées sur des cellules embryogènes de maïs selon le protocole par (???)

4. Régénération et utilisation du gène *bar* comme agent de sélection:

Les cals bombardés sont sélectionnés sur glufosinate jusqu'à l'apparition de setceurs verts.

30 Les cals positifs (?) sont alors convertis en embryons somatiques (*conditions ou référence de la technique?*) puis mis dans les conditions favorisant la germination (*conditions ou référence de la technique?*). Les jeunes plantes sont transférées en serre pour la production de graines (*conditions ou référence de la technique?*).

Les analyses moléculaires (*conditions ou référence de la technique?PCR?*) réalisées sur ces 35 plantes montrent que :

- au moins 4 cals sélectionnés sur phosphinothricine ont engendré des plantes révélant la présence du gène de l'HPPD par PCR;

- au moins 5 cals sélectionnés sur phosphinothricine ont engendré des plantes révélant la présence du gène de l'HPPD par Southern blot;
- au moins 5 cals sélectionnés sur phosphinothricine ont engendré des plantes révélant la présence de la protéine recombinante par Western blot;
- 5 - le gène chimère de l'HPPD et la protéine hétérologue sont absents des cals non transformés.

Ces résultats montrent l'efficacité du gène chimère *bar* pour la sélection des cals transformés contenant un autre gène d'intérêt agronomique.

10 5. Analyse de la descendance des plantes transformées:

Les plantes transformées obtenues ci-dessus ont émis du pollen supposé en partie transgénique, qui a fécondé des ovules d'un maïs sauvage non transgénique. Les graines obtenues sont sélectionnées sur sable après traitement à l'isoxaflutole. Le protocole de sélection est le suivant:

15 800ml de sable de Fontainebleau sont placés dans une barquette de 15 × 20 cm de côtés. Ces barquettes sont alors arrosées par de l'eau et maintenant hydratées par apport d'une solution nutritive constituée de 5ml de Quinoligo (La Quinoléine) par litre d'eau. Vingt graines de maïs sont placées sur les barquettes, qui sont alors traitées à l'isoxaflutole par pulvérisation à raison de 100 à 200g de matière active par hectare (300 ou 600 µg de matière active par barquette). Les barquettes sont ensuite placées en culture en serre.

20

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant:

Génotypes	Isoxaflutole (g/ha)	nombre de graines semées	nombre de plantes germées	nombre de plantes mortes	nombre de plantes survivantes
non transgénique	0	20	20	0	20
	100	20	20	20	0
261 2B 459	100	10	10	5	5
	200	10	9	4	5
261 2D2	100	10	9	6	3
	200	10	10	7	3
261 2A2	100	10	5	3	2
	200	10	7	7	0

Ces résultats montrent l'efficacité du gène de l'HPPD pour la sélection des plantes résistantes de maïs. Ils montrent aussi que la surexpression de l'HPPD de *Pseudomonas* dans les tissus de maïs leur confère la tolérance à l'isoxaflutole.

5 Les séquences illustrées sont les suivantes:

SEQ ID N° 1

Séquence du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32.

SEQ ID N° 2

10 Séquence d'ADNc d'EPSPS d'*Arabidopsis thaliana*

SEQ ID N° 3 et 4

séquences respectivement du gène et de la protéine de l'EPSPS de maïs mutée, partie 1340 pb du clone pRPA-ML-716

15

SEQ ID n° 5 et SEQ ID n° 6

séquences respectivement du gène et de la protéine de l'EPSPS de maïs mutée, partie 1340 pb du clone pRPA-ML-720

20 Les figures ci-après sont données à titre indicatif pour illustrer l'invention.

La Figure 1 représente la séquence protéique de l'HPPD de *Pseudomonas sp.* strain P.J. 874 et la séquence nucléotidique théorique de la partie codante correspondante; les cinq oligonucléotides choisis pour faire l'amplification d'une partie de cette région codante sont symbolisés par les cinq flèches.

25

La Figure 2 représente la cartographie du plasmide avec le fragment d'ADN génomique de 7 kb contenant le gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

30

La Figure 3 donne la comparaison des séquences en acides aminés de l' HPPD de *P. fluorescens* A32 et de l'HPPD de *Pseudomonas sp* strain P.J. 874 (seuls les acides aminés divergents entre les deux séquences sont indiqués) ainsi que la séquence consensus.

Liste des séquences

SEQ ID NO: 1:

ATGGCAGATC TATAcgaaaa CCCAATGGGC CTGATGGCT TTGAATTCA	CGAATTGCGC	60
TCGCCGACCC CGGGTACCCCT GGAGCCGATC TTGAGATCA TGGGCTTCAC	CAAAGTCGCG	120
ACCCACCGTT CCAAGAACGT GCACCTGTAC CGCCAGGGCG AGATCAACCT	GATCCTCAAC	180
AACGAGCCCA ACAGCATCGC CTCTACTTT GCGGCCGAAC ACGGCCCGTC	GGTGTGCGGC	240
ATGGCGTTCC GCGTGAAGGA CTCGAAAGG GCCTACAACC GCGCCCTGGA	ACTCGGCGCC	300
CAGCCGATCC ATATTGACAC CGGGCCGATG GAATTGAACC TGCCGGCGAT	CAAGGGCATC	360
GGCGGCGCGC CGTTGTACCT GATCGACCGT TTCGGCGAAG GCAGCTCGAT	CTACGACATC	420
GACTTCGTGT ACCTCGAAGG TGTGGAGCGC AATCCGGTCG GTGCAGGTCT	CAAAGTCATC	480
GACCACCTGA CCCACAAACGT CTATCGCGC CGCATGGTCT ACTGGGCCAA	CTTCTACGAG	540
AAATTGTTCA ACTTCCGTGA AGCCGCTTAC TTCGATATCA AGGGCGAGTA	CACCGGCCTG	600
ACTTCCAAGG CCATGAGTGC GCCGGACGGC ATGATCCGA TCCCCTGAA	CGAAGAGTCG	660
TCCAAGGGCG CGGGGCAGAT CGAACAGTTC CTGATGCAGT TCAACGGCGA	AGGCATCCAG	720
CACGTGGCGT TCCTCACCGA CGACCTGGTC AAGACCTGGG ACGCGTTGAA	GAAAATCGGC	780
ATGGCGTTCA TGACCGGCC GCCAGACACT TATTACGAA TGCTCGAAGG	CCGCCTGCCT	840
GACCACGGCG AGCCGGTGGGA TCAACTGCAG GCACGGGTA TCCTGCTGGA	CGGATCTTCC	900
GTGGAAGGCG ACAAACGCCT GCTGCTGCAG ATCTTCTCGG AAACCTGAT	GGGCCCGGTG	960
TTCTTCGAAT TCATCCAGCG CAAGGGCGAC GATGGGTTTG GCGAGGGCAA	CTTCAAGGCG	1020
CTGTTCGAGT CCATCGAACG TGACCAGGTG CGTCGTGGTG TATTGACCAC	CGATTAA	1077

SEQ ID NO: 2:

AATCAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTGGGCC CGGGCGCGTG	60
ATCCGGCGGC GGCAGCGCG GCGGCGGTGC AGGCGGGTGC CGAGGAGATC GTGCTGCAGC	120
CCATCAAGGA GATCTCCGGC ACCGTCAAGC TGCCGGGTC CAAGTCGCTT TCCAACCGGA	180
TCCTCCTACT CGCCGCCCTG TCCGAGGGGA CAACAGTGGT TGATAACCTG CTGAACAGTG	240
AGGATGTCCA CTACATGCTC GGGGCCTTGA GGACTCTTGG TCTCTCTGTC GAAGCGGACA	300
AAGCTGCCAA AAGAGCTGTA GTTGTGGCT GTGCTGGAAA GTTCCCAGTT GAGGATGCTA	360
AAGAGGAAGT GCAGCTCTTC TTGGGGAATG CTGGAACCTGC AATGCGGCCA TTGACAGCAG	420
CTGTTACTGC TGCTGGTCCA AATGCAACTT ACGTGCTTGA TGGAGTACCA AGAATGAGGG	480
AGAGACCCAT TGGCGACTTG GTTGTGGAT TGAAGCAGCT TGGTGCAGAT GTTGATTGTT	540
TCCTTGGCAC TGACTGCCA CCTGTTCTG TCAATGGAAT CGGAGGGCTA CCTGGTGGCA	600
AGGTCAAGCT GTCTGGCTCC ATCAGCAGTC AGTACTTGAG TGCCTGCTG ATGGCTGCTC	660
CTTTGGCTCT TGGGGATGTG GAGATTGAAA TCATTGATAA ATTAATCTCC ATTCCGTACG	720
TGAAATGAC ATTGAGATTG ATGGAGCGTT TTGGTGTGAA AGCAGAGCAT TCTGATAGCT	780
GGGACAGATT CTACATTAAG GGAGGTCAAA AATACAAGTC CCCTAAAAAT GCCTATGTTG	840
AAGGTGATGC CTCAAGCGCA AGCTATTTCT TGGCTGGTGC TGCAATTACT GGAGGGACTG	900
TGACTGTGGA AGGTTGTGGC ACCACCAAGT TGCAGGGTGA TGTGAAGTTT GCTGAGGTAC	960
TGGAGATGAT GGGAGCGAAG GTTACATGGA CCGAGACTAG CGTAACGTGTT ACTGGCCCAC	1020
CGCGGGAGCC ATTTGGGAGG AAACACCTCA AGGCAGATTGA TGTCAACATG AACAAAGATGC	1080
CTGATGTCCG CATGACTCTT GCTGTGGTTG CCCTCTTGC CGATGGCCCG ACAGCCATCA	1140
GAGACGTGGC TTCTGGAGA CTAAAGGAGA CCGAGAGGAT GGTTGCGATC CGGACGGAGC	1200
TAACCAAGCT GGGAGCATCT GTTGAGGAAG GGGCGACTA CTGCATCATC ACGCCGCCGG	1260
AGAAGCTGAA CGTGACGGCG ATCGACACGT ACGACGACCA CAGGATGGCC ATGGCCTTCT	1320
CCCTTGCCGC CTGTGGCGAG GTCCCCGTCA CCATCCGGGA CCCTGGGTGC ACCCGGAAGA	1380
CCTTCCCCGA CTACTTCGAT GTGCTGAGCA CTTTCGTCAA GAATTAATAA AGCGTGCAGAT	1440
ACTACCACGC AGCTTGATTG AAGTGATAGG CTTGTGCTGA GGAAATACAT TTCTTTGTT	1500
CTGTTTTCT CTTTCACCGG ATTAAGTTT GAGTCTGTAA CGTTAGTTGT TTGTAGCAAG	1560
TTTCTATTTG GGATCTTAAG TTTGTGCACT GTAAGCCAAA TTTCATTCA AGAGTGGTTC	1620
GTGGAATAA TAAGAATAAT AAATTACGTT TCAGTGAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA	1680
AAAAAAA AAAAAAAA AACCGGGAA TTC	1713

SEQ ID NO: 3:

CCATG GCC GGC GCC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC	47
Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile	
1 5 10	
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC	95
Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile	
15 20 25 30	
CTC CTA CTC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG	143
Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu	
35 40 45	
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT	191
Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu	
50 55 60	
GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTA GTT GTT	239
Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val	
65 70 75	
GGC TGT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG	287
Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln	
80 85 90	
CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ACT GCA ATG CGG CCA TTG ACA GCA GCT	335
Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala	
95 100 105 110	
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA	383
Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro	
115 120 125	
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG	431
Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln	
130 135 140	
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT	479
Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val	
145 150 155	
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT	527
Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser	
160 165 170	
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT	575
Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro	
175 180 185 190	
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC	623
Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser	
195 200 205	
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG	671
Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val	
210 215 220	
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT	719
Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly	
225 230 235	
CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA	767
Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser	
240 245 250	

SEQ ID NO: 3 (suite)

AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 265 270	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 275 280 285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CCG CGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GCC CTC TTT GCC SAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380	1151
TAC TGC ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACC GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395	1199
ACG TAC GAC GAC CAC AGG ATG GCC ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCG TGT Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 400 405 410	1247
GCC GAG GTC CCC GTC ACC ATC CGG GAC CCT GGG TGC ACC CGG AAG ACC Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 415 420 425 430	1295
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440	1337
TAA	1340

SEQ ID NO: 4:

Ala Gly Aia Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30

Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45

Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60

Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80

Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95

Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110

Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125

Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140

Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160

Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175

Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190

Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205

Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220

Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240

Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255

Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270

Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285

Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300

Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320

Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335

Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350

SEQ ID NO: 4 (suite)

Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
370 375 380

Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
385 390 395 400

Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
405 410 415

Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
420 425 430

Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
435 440

SEQ ID NO: 5:

CCATG GCC GGC GGC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile 1 5 10	47
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile 15 20 25 30	95
CTC CTA CTC GCC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu 35 40 45	143
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu 50 55 60	191
GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTC GTT GTT Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val 65 70 75	239
GCG TGT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln 80 85 90	287
CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ATC GCA ATG CGG TCC TTG ACA GCA GCT Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala 95 100 105 110	335
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTC CCA Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro 115 120 125	383
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln 130 135 140	431
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val 145 150 155	479
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser 160 165 170	527
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro 175 180 185 190	575
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser 195 200 205	623
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val 210 215 220	671
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly 225 230 235	719
CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 240 245 250	767

SEQ ID NO: 5 (suite)

AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 265 270	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 270 275 280 285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CCG CGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GCC CTC TTT GCC GAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTC AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380	1151
TAC TGC ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395	1199
ACG TAC GAC GAC CAC AGG ATG GCG ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 400 405 410	1247
GCC GAG GTC CCC GTC ACC ATC CGG GAC CCT GGG TGC ACC CGG AAG ACC Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 415 420 425 430	1295
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440	1337
TAA	1340

SEQ ID NO: 6:

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30

Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45

Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60

Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80

Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95

Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110

Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125

Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140

Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160

Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175

Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190

Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205

Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220

Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240

Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255

Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270

Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285

Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300

Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320

Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335

Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350

SEQ ID NO: 6 (suite)

Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
370 375 380

Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
385 390 395 400

Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
405 410 415

Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
420 425 430

Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
435 440

Revendications

5

1. Gène chimère comprenant au moins deux gènes chimères élémentaires comprenant chacun des éléments de régulation nécessaires à sa transcription dans les plantes et une séquence codante codant pour une enzyme conférant aux plantes la tolérance à un herbicide, caractérisé en ce que l'une des séquences codantes code pour l'hydroxy-phényle pyruvate dioxygénase (HPPD).
10
2. Gène chimère selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un troisième gène chimère contenant une séquence codante pour une enzyme conférant aux plantes une tolérance herbicide.
15
3. Gène chimère selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la seconde séquence codante est issu d'un gène de nitrilase *Klebsiella sp.* conférant une tolérance à un herbicide de la famille des dihalogénohydroxybenzonitriles.
20
4. Gène chimère selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'herbicide est le bromoxynil.
5. Gène chimère selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'herbicide est l'ioxynil.
25
6. Gène chimère selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la seconde séquence codante code pour une tolérance au glyphosate.
7. Gène chimère selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que la seconde séquence codante code pour une EPSPS conférant une tolérance à un herbicide inhibiteur de l'EPSPS.
30
8. Gène chimère selon la revendication 7, caractérisé en ce que la seconde séquence codante code pour une EPSPS conférant une tolérance au glyphosate.
9. Gène chimère selon la revendication 6, caractérisé en ce que la seconde séquence codante code pour la glyphosate oxydoréductase, enzyme de détoxification du glyphosate.
35

10. Gène chimère selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la séquence codante pour l'HPPD est issue de *Pseudomonas sp.*
11. Gène chimère selon la revendication 10, caractérisé en ce que la séquence codante pour l'HPPD est issue de *Pseudomonas fluorescens*.
5
12. Gène chimère selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la séquence codante pour l'HPPD est d'origine végétale.
- 10 13. Gène chimère selon la revendication 12, caractérisé en ce que la séquence codante pour l'HPPD est issue de *Arabidopsis thaliana*.
14. Gène chimère selon la revendication 11, caractérisé en ce que la séquence codante pour l'HPPD est issue de *Daucus carota*.
15
15. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon l'une des revendications 1 à 14.
16. Vecteur selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il est constitué par un plasmide.
20
17. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle contient au moins deux gènes contenant chacun une séquence codante codant pour une enzyme conférant aux plantes la tolérance à un herbicide, dont l'un est un inhibiteur de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).
25
18. Cellule végétale selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle contient trois gènes chimères élémentaires contenant chacun des éléments de régulation et une séquence codante codant pour une enzyme conférant aux plantes la tolérance à un herbicide.
- 30 19. Cellule végétale selon l'une des revendications 17 et 18, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un gène chimère, selon l'une des revendications 1 à 14.
20. Plante, caractérisée en ce qu'elle contient une cellule végétale selon l'une des revendications 17 à 19.
35

21. Procédé de transformation des plantes pour les rendre tolérantes à au moins deux herbicides, caractérisé en ce qu'on insère dans une cellule végétale un gène selon les revendications 1 à 14 et que les cellules transformées sont soumises à une régénération.

5 22. Procédé d'obtention de plantes à tolérance herbicide multiple par transgénèse des plantes, caractérisé en ce que:

- dans une première étape, on insère dans plusieurs cellules respectivement un des gènes élémentaires contenant chacun des éléments de régulation nécessaires à sa transcription dans les plantes et une séquence codante codant pour une enzyme conférant aux plantes la tolérance à un herbicide, et que
- 10 - ensuite les plantes sont croisées pour obtenir des plantes à tolérance multiple.

23. Procédé de traitement herbicide de plantes selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'on applique au moins deux herbicides.

15 24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'on applique trois herbicides.

25. Procédé selon l'une des revendications 21 à 24, caractérisé en ce que l'un des herbicides est un inhibiteur de l'HPPD.

20 26. Procédé selon l'une des revendications 21 à 25, caractérisé en ce que les deux herbicides sont appliqués simultanément.

27. Procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce que les deux herbicides sont appliqués sous la forme d'une seule composition prête à l'emploi.

25 28. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que les deux herbicides sont appliqués sous la forme d'un mélange extemporané.

30 29. Procédé l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que les deux herbicides sont appliqués successivement.

30. Procédé selon l'une des revendications 22 à 29, caractérisé en ce que l'herbicide inhibiteur de l'HPPD est l'isoxaflutole.

35 31. Procédé selon l'une des revendications 22 à 29, caractérisé en ce que l'herbicide inhibiteur de l'HPPD est la sulcotrione.

32. Procédé selon l'une des revendications 22 à 31, caractérisé en ce que l'herbicide appartient à la famille des dihydrogènohydroxybenzonitriles.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que l'herbicide est choisi dans le
5 groupe comprenant le bromoxynil et l'ioxynil

34. Procédé selon l'une des revendications 22 à 33, caractérisé en ce que l'herbicide inhibiteur de l'EPSPS est le glyphosate ou le sulfosate.

1 / 5

100

ATHGARGARTTYAATGGARTTYAAYGGNGARGGNATHCARCAYGTTGCNTTGTWSNGAYGATTNAATHAAR
 I E E F L W Q F N G E G I Q H V A F L S D D L I K 750
 ↓
 ACNTGGGAYCATTNAARWSNATHGCHATGHNNTTATGACHGCNCNCNGAYACHTATGARATGTTGAR
 T W D H L K S I G M R F H T A P P D T Y Y E M L E 825
 ↓
 GGNAGNTTCCNAAYCAYGGNGARC CNGTNGGNGGARYTNCARGCNGNG NATHYTNTGAYGGNWSNSNGAR
 G R L P N H G E P V G E L Q A R G I L L D G S S E 900
 ↓
 MSNGGGAYAARHGGNTTNTTNCARATHTTWSNGARACNTTNTATGGG NCNGNTNTTGTGATTYATHCAR
 S G D K R L L Q I F S E T L W G P V F F E F I Q 975
 ↓
 HGNAAARGGGAYAAYGGNTTGGG ARGGNAYTTAARGCNYTNTTGA RWSNATHCARWNGAYCARGTNAGN
 R K G D D G F G E G N F K A L F E S I E R D Q V R 1050
 ↓
 MGNGGGTNTTWSNGAY
 R G V L S T D 1071

Fig 1 (suite)

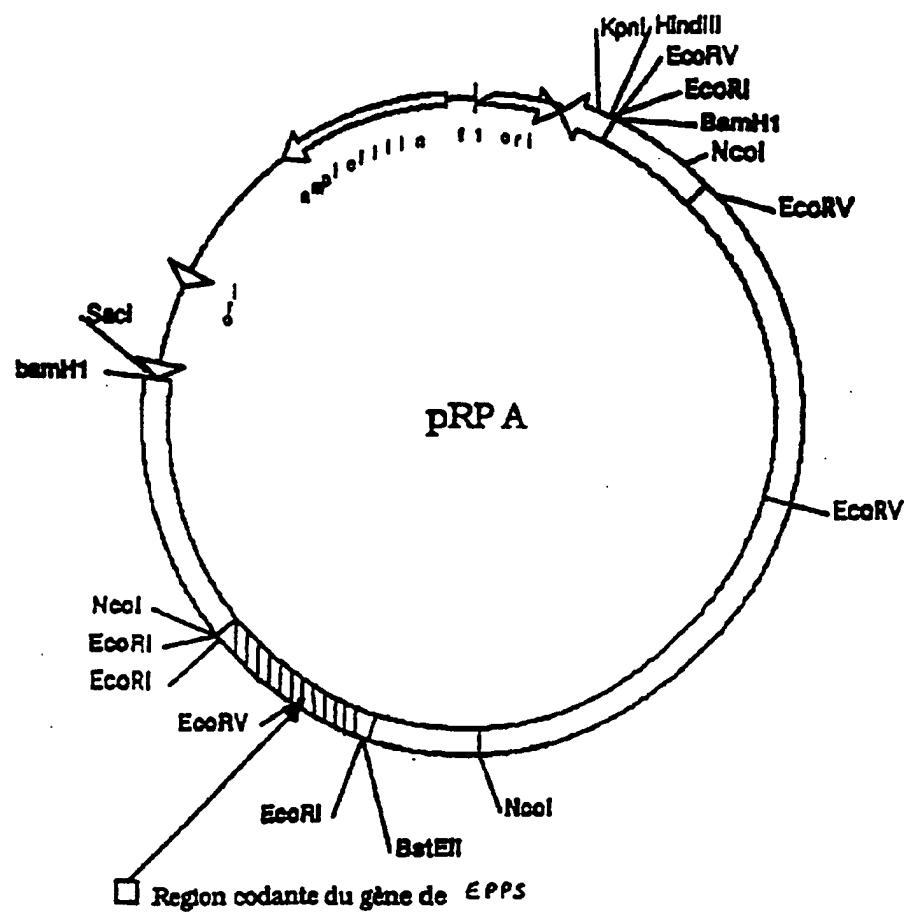


Fig 2

Consensus	.ADLYENPMAG	LWGFEEFIE.A	SPTP.TLEPI	FEIHCFTKVA	THR SK.WHLY	50
P. fluorescens	W.....	F.....	G.....N.....	50
Pseudomonas sp.	L.....	N.....D.....	49
Consensus	RQG.INLILN	NEP.S.ASYF	AAEHGPSSVCG	WAFFRKDSQK	AY.RALELGA	100
P. fluorescens	...E.....	...N.I.....N.....	100
Pseudomonas sp.	...A.....	...H.V.....K.....	99
Consensus	QPTHI.TGPM	E1NLPAIKGI	GGAPLYLIDR	FGE6SS1YDI	DFV.LEGV.R	150
P. fluorescens	...D.....Y.....E.	150
Pseudomonas sp.	...E.....F.....D.	149
Consensus	.PVGAGLK.I	DHLTHMVYRG	RH.YMANFYE	KLFNFRE.RY	FDIKGEYTL	200
P. fluorescens	N.....V.	Y.....A.....	200
Pseudomonas sp.	H.....I.	A.....I.....	199
Consensus	TSKAW.APDG	WIRIPLNEES	SKGAGQIEEF	LNQFNGEIQ	HW AFL.DDL.	250
P. fluorescens	...S.....T..Y	250
Pseudomonas sp.	...T.....S..I	249

Fig 3

Consensus	KTWD.LK.IG	WRFNTAPPDT	YYEHLLEGRLP	·HGEPV..LQ	ARGILLDGSS	300
<i>P. fluorescens</i>	...A..K..	D.....DQ..	300
<i>Pseudomonas</i> sp.	...H..S..	N.....GE..	299
Consensus	..GDKRLLQ	IFSETLMGPY	FFEFIQRKGD	DGFGEGNFKA	LFESTIERDQV	350
<i>P. fluorescens</i>	VE.....	350
<i>Pseudomonas</i> sp.	ES.....	349
Consensus	RRGYL..D					358
<i>P. fluorescens</i>TA..					358
<i>Pseudomonas</i> sp.ST..					357

Fig 3 (suite)